



Gateway[®]LR クロナーゼ[™]II 酵素ミックス

カタログ番号 11791-020

サイズ：20 反応分

カタログ番号 11791-100

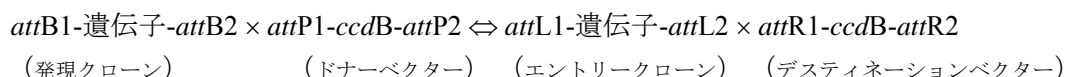
サイズ：100 反応分

-20°C で保存（自動霜取り機能を持たないフリーザー）

※長期保存には-80°Cでの保存をお勧めします。

Gateway[®]テクノロジー

Gateway[®]テクノロジーは、λファージの部位特異的組換え反応（1）を利用して DNA 配列を迅速かつ効率的に移し換える、汎用性の高いクローニング技術です。以下に、Gateway[®]テクノロジーの概略を示します。



Gateway[®]BP クロナーゼ[™]II 酵素ミックスは *attB*×*attP* 間の組換え反応を触媒し、Gateway[®]LR クロナーゼ[™]II 酵素ミックスは *attL*×*attR* 間の組換え反応を触媒します。「*ccdB*」は F プラスミドにコードされた大腸菌の生育を阻害する遺伝子（2、3）を、「遺伝子」は任意の目的 DNA 断片（PCR 産物、cDNA、ゲノム DNA など）を意味します。

製品概要

Gateway[®]LR クロナーゼ[™]II 酵素ミックスは、酵素とバッファーを混合したプレミックスタイプの試薬です。λファージ由来のインテグラーゼ（Int）、切出し酵素（Xis）、大腸菌由来の組込み宿主因子（IHF）（1）、および反応バッファーを混合したもので、反応液の調製を簡便に行えます。Gateway[®]LR クロナーゼ[™]II 酵素ミックスは、エントリークローン（*attL*-遺伝子-*attL*）と *attR* サイトを持つデスティネーションベクターとの間の *in vitro* 組換え反応を触媒し、*attB* サイトを持つ発現クローンを生成します。Gateway[®]LR クロナーゼ[™]II 酵素ミックスは、-20°C（自動霜取り機能を持たないフリーザー）で最長 6 ヶ月間保存できます。なお、長期保存する場合には、-80°Cでの保存をお勧めいたします。

内容

	20 反応	100 反応
Gateway [®] LR クロナーゼ [™] II 酵素ミックス	40 μL	200 μL
Proteinase K 溶液（2 μg/μL）	40 μL	200 μL
pENTR [™] -gus ポジティブコントロール（50 ng/μL）	20 μL	20 μL

品質管理

組換え反応を 1 時間行った後に形質転換を実施することにより、LR クロナーゼ[™]II 酵素ミックスの機能を確認しています。

パート番号 11791.II.pps

更新日：2011 年 1 月 31 日

This product is distributed for laboratory research only. CAUTION: Not for diagnostic use. The safety and efficacy of this product in diagnostic or other clinical uses has not been established.

For technical questions about this product, call the Invitrogen Tech-LineSM U.S.A. 800 955 6288

推奨事項およびガイドライン

- LR 反応のポジティブコントロール用に、pENTR™-gus が添付されています。pENTR™-gus は、シロイヌナズナの β -グルクロニダーゼ (gus) 遺伝子を含むエントリークローンです (4)。pENTR™-gus のマップおよび配列は、弊社のウェブサイトで検索していただけます。
(<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support.html>)
- LR 反応には PureLink™HQ Mini Plasmid DNA 精製キット (カタログ番号 K2100-01) で精製したプラスミドの使用をお奨めします。その他一般的なミニプレップ (アルカリ溶解) により調製されたプラスミドは Gateway® クローニング反応に適していますが、反応効率が低下する可能性がありますので、できるだけ精製度の高いプラスミドをご使用ください。
- LR 反応の効率のよい基質として、attL サイトを持つスーパーコイル状のエントリークローンおよび attR サイトを持つスーパーコイル状のデスティネーションベクターを使用できます。ただし、ベクターを直鎖状にすることにより組み換え効率が上昇することが知られています。特にサイズの大きい (10 kb を超える) エントリークローンまたはデスティネーションベクターを使用する場合は、ベクターを直鎖状にすることをお奨めします。
- 目的の発現クローンを含むコロニー数を増加させるには、インキュベーション時間を推奨の 1 時間から、2 時間～一晩に延長させてください。10 kb 以上のプラスミドを使用して組み換えを行う際は、インキュベーション時間を長くすることをお奨めします。
- 10 μ L の反応液あたり 50~150 ng のエントリークローンを使用することをお奨めします。エントリークローンの量が多すぎると複数の DNA 分子を含むコロニー (多くの場合、コロニーサイズが小さくなります) の出現が問題になることがあります。その際は、使用するエントリークローンの量を少なめ (50 ng 程度) にしてください。

手順

LR 反応

LR クロナーゼ™II 酵素ミックスは 5 倍濃度の溶液です。反応容量を変更する場合は、LR クロナーゼ™II 酵素ミックスの最終濃度が 1 倍となるようにしてください。ポジティブコントロールについては、pENTR™-gus を 100 ng (2 µL) ご利用ください。

1. 室温でチューブに以下の試薬を加えて混合します。

エントリークローン (50-150 ng)	1-7 µL
デスティネーションベクター (150 ng/µL)	1 µL
TE バッファー (pH8.0)	トータル 8 µL
2. LR クロナーゼ™II 酵素ミックスを氷上で約 2 分間静置し解凍します。LR クロナーゼ™II 酵素ミックスをよく混合します。
3. 各サンプル (上期ステップ 1) に 2 µL の LR クロナーゼ™II 酵素ミックスを加えてよく混合します。軽く微量遠心分離機にかけます。
4. LR クロナーゼ™II 酵素ミックスを -20°C または -80°C のフリーザーに戻します。
5. 混合物を 25°C で 1 時間インキュベーションします。
6. 1 µL の Proteinase K 溶液を各サンプルに加えよく混合した後、37°C で 10 分間インキュベーションします。

形質転換

1. 1 µL の LR 反応液を 50 µL の One Shot®OmniMAX™2 T1 Phage-Resistant Cells (カタログ番号 C8540-03) に添加します。氷上で 30 分間インキュベーションします。42°C で 30 秒間インキュベーションして細胞にヒートショックを与えます。250 µL の S.O.C.培地を加え、37°C で攪拌しながら 1 時間インキュベーションします。20 µL および 100 µL の形質転換物をセレクションプレート上に撒きます。注：形質転換率が $>1.0 \times 10^8$ 形質転換体/µg であれば、どんなコンピテントセルでも使用できます (ただし、ccdB 耐性株は使用できません)。
2. (形質転換効率の評価) 上記に従い 1 µL の pUC19 DNA (10 pg/µl) を用いて 50 µL の One Shot®OmniMAX™2 T1 Phage-Resistant Cells を形質転換します。20 µL および 100 µL を、100 µg/mL のアンピシリンを含む LB プレート上に撒きます。

予想される結果

効率の高い場合は、LR 組換え反応液全てを形質転換に使用し、全量をプレートに撒いた場合、5000 個を超えるコロニーが生成されます。

References

1. Landy, A. (1989) *Ann. Rev. Biochem.* 58, 913.
2. Bernard, P. and Couturier, M. (1992) *J. Mol. Biol.* 226, 735.
3. Miki, T., Park, J.A., Nagao, K., Murayama, N., and Horiuchi, T. (1992) *J. Mol. Biol.* 225, 39.
4. Kertbundit, S., Greve, H.D., Deboeck, F., Montagu, M.V., and Hernalsteens, J.P. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 5212.